

# Bioclin

## BIOLISA HBsAg

REF **K120**

### INSTRUÇÕES DE USO

#### FINALIDADE

Teste para detecção qualitativa da presença do antígeno de superfície do vírus da Hepatite B em amostras biológicas (soro e plasma colhido com EDTA ou Heparina), através de teste enzimaimunoensaio. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

#### PRINCÍPIO DE AÇÃO

**Metodologia:** Enzimaimunoensaio ou imunoenzimático

O kit BIOLISA HBsAg é um ensaio imunoenzimático em fase sólida com base no princípio “sanduíche” para a detecção do HBsAg em soro ou plasma (EDTA ou Heparina) humano. A microplaca é revestida com anticorpos monoclonais específicos para os subtipos Ad e Ay do HBsAg. No primeiro momento, amostra e conjugado são adicionados à microplaca revestida com anticorpo e são incubados. Se a amostra contiver HBsAg, este se ligará aos anticorpos que revestem a microplaca e, simultaneamente, se ligarão ao conjugado para formar complexos Anticorpo-HBsAg-Conjugado. Após a incubação a microplaca é lavada para remoção dos materiais não ligados. Após esta etapa, o Substrato é adicionado e incubado, produzindo uma cor azul que indica a presença de antígeno de Hepatite B presente na amostra. A Solução de Parada é adicionada para interromper a reação, havendo uma mudança da cor azul para amarelo, medida em um leitor de microplacas.

#### REAGENTES

**1- Placa Sensibilizada** - Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Microplaca revestida com anticorpos (monoclonal de camundongo) anti-HBs.

**2- Conjugado** - Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Anticorpos anti-HBs ligados a Peroxidase, surfactante, estabilizantes, corante e conservante.

**3- Lavagem Concentrada** - Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Solução tampão (Fosfato < 0,5 mol/L, Cloreto de Potássio < 100 mmol/L, Cloreto de Sódio < 5 mol/L), surfactante e conservante.

**4- Substrato** - Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Solução Tampão contendo Peróxido de Ureia, Tetrametilbenzidina (TMB) e conservante.

**5- Solução de Parada** - Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Ácido sulfúrico 1 N.

**6- Controle Negativo** - Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Solução não reativa para HBsAg, HCV, HIV-1 e HIV-2, estabilizante e conservante. **Potencialmente infectante.**

**7- Controle Positivo** - Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Solução reativa para HBsAg e não reativa para HCV, HIV-1 e HIV-2, corante, estabilizante e conservante. **Potencialmente infectante.**

**8- Seladores de Placa.**

#### APRESENTAÇÃO

REAGENTES	1	2	3
	96 Cavidades	192 Cavidades	480 Cavidades
<b>1- Placa Sensibilizada</b>	1 Unidade	2 Unidades	5 Unidades
<b>2- Conjugado</b>	1 Frasco x 8 mL	2 Frascos x 8 mL	5 Frascos x 8 mL
<b>3- Lavagem Concentrada</b>	1 Frasco x 50 mL	2 Frascos x 50 mL	5 Frascos x 50 mL
<b>4- Substrato</b>	1 Frasco x 12 mL	2 Frascos x 12 mL	5 Frascos x 12 mL
<b>5- Solução de Parada</b>	1 Frasco x 12 mL	2 Frascos x 12 mL	5 Frascos x 12 mL
<b>6- Controle Negativo</b>	1 Frasco x 1 mL	2 Frascos x 1 mL	5 Frascos x 1 mL
<b>7- Controle Positivo</b>	1 Frasco x 1 mL	2 Frascos x 1 mL	5 Frascos x 1 mL
<b>8- Seladores de Placa</b>	3 Unidades	6 Unidades	15 Unidades

#### EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

**Materiais contidos no kit:**

- Reagentes descritos no quadro anterior

**Materiais necessários, não contidos no kit:**

**1-** Pipetas capazes de dispensar volumes de 5 a 300 µL com coeficiente de variação menor que 1,5%.

**2-** Repipetador para pipetagens repetitivas de volumes de 300 µL com coeficiente de variação menor que 1,5% ou pipeta multicanal (opcional).

**3-** Lavadora de microplaca (opcional).

**4-** Leitora de ELISA com capacidade de absorvância em 450 e 630 nm de comprimento de onda.

**5-** Papel absorvente para secar as microcavidades.

**6-** Cronômetro ou relógio.

**7-** Frasco para estocar a Solução de Lavagem após diluída.

**8-** Água destilada ou deionizada.

**9-** Ferramentas de Controle de Qualidade.

**10-** Incubadora de 37 °C ± 2 °C.

#### CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

A temperatura de armazenamento deverá ser de 2 a 8 °C. O transporte, em temperatura ambiente (até 30 °C), não deverá exceder 5 dias. Manter ao abrigo da luz e evitar umidade. **Não congelar.**

#### CUIDADOS ESPECIAIS

**1- Somente para uso diagnóstico *in vitro* profissional.**

**2-** Seguir com rigor a metodologia proposta para a obtenção de resultados exatos.

**3-** O sachê contendo a microplaca deve ser aberto somente após atingir a temperatura ambiente. Recolocar as tiras de microcavidades não utilizadas no sachê, vedar e estocar entre 2 e 8 °C.

**4-** A água utilizada na limpeza do material deve ser recente e isenta de contaminantes.

**5-** Colunas deionizadoras saturadas liberam água alcalina, íons diversos, e agentes oxidantes e redutores que podem alterar de forma significativa os resultados.

**6-** A Solução de Parada contém Ácido Sulfúrico que é um ácido forte. Portanto, manuseá-lo com devido cuidado.

**7-** Toda matéria-prima do produto é testada e deve ser não reagente para Anti-HIV 1&2 e Anti-HCV. Entretanto, esses testes não oferecem total segurança da ausência de agentes

infecciosos. A manipulação de todo produto que contém soro é potencialmente capaz de transmitir doenças. Portanto, é preciso tomar os devidos cuidados de biossegurança na manipulação desses produtos.

**8-** Pipetar os reagentes sempre na mesma ordem para minimizar a diferença de tempo de reação entre as microcavidades.

**9-** Por medida de proteção, deve-se cobrir a placa durante a reação.

**10-** Deve-se assegurar que o fundo da cavidade esteja limpo e seco, e que não haja bolhas na superfície do líquido antes de ler a placa. Não permitir que as cavidades sequem durante o ensaio.

**11-** Não exponha os reagentes, especialmente o Substrato, à luz forte ou vapores de hipoclorito durante o armazenamento ou etapas de incubação.

**12-** Recomendamos aplicar as normas locais, estaduais e federais de proteção ambiental para que o descarte dos reagentes e do material biológico seja feito de acordo com a legislação vigente.

**13-** Para obtenção de informações relacionadas à biossegurança ou em caso de acidentes com o produto, consultar as FDS (Ficha de Dados de Segurança) disponibilizadas no site [www.bioclin.com.br](http://www.bioclin.com.br) ou através de solicitação pelo SAC (Serviço de Assessoria ao Cliente) da Quibasa.

**14-** Não utilizar o produto em caso de danos na embalagem.

**15-** É imprescindível que os instrumentos e equipamentos utilizados estejam devidamente calibrados e submetidos às manutenções periódicas.

#### AMOSTRAS

**Soro ou plasma (EDTA ou Heparina).**

Amostras hemolisadas e altamente lipêmicas não devem ser usadas. As amostras podem ser conservadas sob refrigeração, entre 2 e 8 °C, pelo período máximo de 5 dias. Se as amostras não puderem ser analisadas dentro de 5 dias, podem ser estocadas por até 30 dias a temperatura de -20 °C. Amostras de plasma armazenadas por períodos superiores ao preconizado (30 dias) podem apresentar fibrina e precipitação de fibronectina que podem interferir no teste. Amostras coletadas com outros anticoagulantes, diferentes dos citados, não devem ser utilizadas.

#### DESCRIÇÃO DO PROCESSO

**Estabilidade Após Aberto**

Os resultados do teste de estabilidade comprovam que o kit BIOLISA HBsAg é estável após aberto por até 30 dias. Esta estabilidade pode variar de acordo com as condições do teste e do ambiente. Portanto, sugere-se acompanhar o desempenho do produto utilizando controles internos do kit e os critérios de validação da técnica

#### PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO

**Solução de Lavagem**

Diluir o conteúdo do frasco Nº 3 (Lavagem Concentrada) na proporção 1:20 de água destilada ou deionizada; por exemplo: 50 mL de solução de Lavagem Concentrada em 1000 mL de água destilada ou deionizada. Após o preparo, a solução pode ser estocada entre 2 e 30 °C por até 30 dias. Caso ocorra cristalização, aquecer a 37 °C até dissolução.

**Nota:** Pode ocorrer a formação de pequenos agregados gelatinosos no reagente Nº 3 (Lavagem Concentrada), que são facilmente dissolvidos após a diluição. Dessa forma, caso seja observada essa característica no reagente, proceder normalmente conforme o procedimento descrito acima.

**Todos os demais reagentes são prontos para uso.**

#### TÉCNICA

**Para uso em equipamentos automáticos, consulte ao SAC (Serviço de Assessoria de Cliente).**

Antes de iniciar o ensaio, colocar todos os reagentes, amostras e controles para estabilizarem em temperatura ambiente (15 – 30 °C) por no mínimo 40 minutos.

**1-** Separar as cavidades a serem utilizadas considerando: Controles e Amostras (recomenda-se testar em duplicata). Retornar as tiras não utilizadas da microplaca para a embalagem original selada.

**2-** Separar a primeira cavidade para o Branco (OPCIONAL).

**3-** Pipetar 50 µL de Controle Negativo, Controle Positivo e Amostras nas cavidades previamente determinadas.

**4-** Pipetar 50 µL de Conjugado em todas as cavidades, **exceto** na cavidade do Branco.

**5-** Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos. Cobrir as cavidades com selador de placa.

**6-** Incubar por 80 minutos ± 2 minutos a 37 °C ± 2 °C.

**7-** Retirar o selador de placa das cavidades.

**8-** Descartar o conteúdo das cavidades por aspiração (Lavadora) ou por decantação (Manual). Usar 350 µL aproximadamente de Solução de Lavagem, **previamente preparada**, e efetuar um total de oito (8) ciclos de lavagem com agitação (shake) de 5 segundos. Para a garantia da secagem da placa, ao final da lavagem, bater a placa por alguns segundos em papel absorvente.

**Nota:** Lavagem/secagem deficiente pode causar resultados inadequados.

**9-** Pipetar 100 µL de Substrato em todas as cavidades, **inclusive** na cavidade do Branco.

**10-** Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos. Cobrir as cavidades com o selador de placa.

**11-** Incubar por 10 minutos ± 2 minutos a 37 °C ± 2 °C.

**12-** Retirar o selador de placa das cavidades.

**13-** Pipetar 100 µL de Solução de Parada em todas as cavidades.

**14-** Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos.

**15-** Ler utilizando filtro duplo: 450 nm / 630 nm em até 15 minutos (no máximo).

#### VERIFICAÇÃO DA TÉCNICA

Verifique se os resultados obtidos para leitura dos controles estão compatíveis com os valores apresentados abaixo:

ITEM	ABSORVÂNCIA
<b>Branco</b>	< 0,100
<b>Controle Negativo</b>	< 0,100
<b>Controle Positivo</b>	> 1,000

**Nota:** Se os valores forem encontrados fora do especificado, deve-se repetir a técnica. Os valores dos Controles e Amostras não devem ser subtraídos do valor do Branco, caso se tenha feito a opção de usar.

#### CÁLCULOS

#### QUALITATIVO

Calcular o Cut Off de acordo com a seguinte fórmula:

Cut-Off: Absorvância Média Obtida com o Controle Negativo + 0,050.

Exemplo:

ITEM	ABSORVÂNCIA
<b>Controle Negativo</b>	A1 = 0,040
	A2 = 0,041
<b>Cut-Off: (Absorvância média do Controle Negativo) + 0,050</b>	$(0,040 + 0,041) / 2 + 0,050 = 0,091$

Calcular o Índice dividindo a absorbância da amostra pelo valor de Cut Off.

Exemplo:

ITEM	ABSORBANCIA
Amostra	2,145
Valor de Cut-Off	0,091
Índice = Amostra / Valor de Cut-Off	2,145 / 0,091 = 23,6

**Nota:** Os dados apresentados nos exemplos são apenas para ilustração e não podem ser usadas para cálculo dos resultados.

### INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS

Após o cálculo do índice das amostras, considerar os índices abaixo para determinação dos resultados.

RESULTADOS	QUALITATIVO
	ÍNDICE
<b>Negativo (Não Reagente)</b>	< 0,9
<b>Indeterminado</b>	Entre 0,9 e 1,1
<b>Positivo (Reagente)</b>	> 1,1

### NÃO REAGENTE

Amostra com absorbância menor que o cut-off ou índice menor que 0,9 é considerada não reativa para antígeno da Hepatite B e pode ser considerada negativa.

### REAGENTE

Amostra com absorbância superior ao cut-off ou índice superior a 1,1 é considerada inicialmente reativa para antígeno da Hepatite B. A amostra deve ser reanalisada em duplicata antes do final da interpretação. A amostra que for reativa em pelo menos uma das reanálises, se presume ser positiva, e deve ser confirmada através de método confirmatório.

**Observação:** No caso de resultado indeterminado, a amostra deve ser reanalisada. As amostras que obtiverem resultados repetidamente indeterminados devem ser retestadas utilizando um método alternativo. Se os resultados permanecerem indeterminados, deve-se coletar uma nova amostra em duas semanas. Deve prevalecer o resultado da última amostra coletada. A interpretação de um teste diagnóstico não deve ser estabelecida com base em um único ensaio. Devem-se incluir outros testes de confirmação antes que uma amostra seja considerada positiva. Um resultado negativo não exclui a possibilidade de exposição. Todos os resultados devem ser interpretados em conjunto com outras informações clínicas disponíveis, antes do diagnóstico descritivo da doença.

**Nota:** Os dados apresentados nos exemplos são apenas para ilustração e não podem ser usados para cálculo dos resultados.

### LIMITAÇÕES DO PROCESSO

A interpretação de um teste diagnóstico, não deve ser estabelecida com base em um único ensaio. Todos os resultados devem ser interpretados em conjunto com outras informações clínicas disponíveis antes do diagnóstico definitivo. Os resultados fornecidos por este kit devem ser interpretados pelo profissional médico responsável, não sendo o único critério para a determinação do diagnóstico e/ou tratamento do paciente.

**Nota:** Cuidado para não tocar na superfície interna do poço com a ponta da pipeta quando o conjugado for dispensado. Pode ocorrer contaminação

### INTERFERENTES

Nenhuma interferência foi observada por Triglicérides 1500 mg/dL, Ácido Acetilsalicílico 20 mg/dL, Ácido Ascórbico 2 g/dL, Creatinina 200 mg/dL, Bilirrubina 1 g/dL, Albumina 10 g/dL, Hemoglobina 1000 mg/dL, Ácido Oxálico 60 mg/dL, Fator Reumatóide 980 UI/mL, Proteína C Reativa 41,2 mg/dL e Anti-Estreptolisina O 1023 UI/mL. Amostras de plasma colhidas em EDTA e Heparina podem ser utilizadas. Amostras coletadas com outros anticoagulantes diferentes dos citados não podem ser utilizadas. Amostras de plasma armazenadas por períodos superiores ao preconizado (30 dias) podem apresentar fibrina e

precipitação de fibronectina que podem interferir no teste.

### REATIVIDADE CRUZADA

Um estudo de reatividade cruzada foi realizado, avaliando 08 amostras positivas para HTLV, 08 amostras positivas para HIV, 08 amostras positivas para CMV, 08 amostras positivas para Doença de Chagas, 08 amostras positivas para Zika, 08 amostras positivas para Rubéola, 08 amostras positivas para Toxoplasmose e 08 amostras positivas para Sífilis. Não foi observado reatividade cruzada com amostras positivas para HTLV, HIV, CMV, Doença de Chagas, Zika, Rubéola, Toxoplasmose e Sífilis. Apesar dos resultados encontrados, não se pode descartar completamente a possibilidade de reatividade cruzada. O diagnóstico final deve considerar os dados clínicos do paciente juntamente com outros dados laboratoriais.

### CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE

O Laboratório Clínico deve possuir um programa interno de controle da qualidade, onde procedimentos, normas, limites e tolerância para variações sejam claramente estabelecidos. É importante ressaltar que todos os sistemas de medição apresentam uma variabilidade analítica característica, que deve ser monitorada pelos próprios laboratórios. Para tanto, é recomendável a utilização de controles, que permitem avaliar a precisão e a exatidão das dosagens.

### DESEMPENHO DO PRODUTO

### PRECISÃO

#### Repetibilidade

A repetibilidade foi calculada a partir de 10 determinações sucessivas, utilizando 3 amostras com valores diferentes, obtendo-se os seguintes resultados de absorbância:

Repetibilidade	AMOSTRA		
	1	2	3
<b>Média</b>	1,709	1,500	0,019
<b>Desvio Padrão</b>	0,075	0,119	0,002
<b>Coefficiente de Variação (%)</b>	4,40	7,94	11,66

#### Reprodutibilidade

A reprodutibilidade foi calculada a partir de 10 determinações sucessivas durante 3 dias consecutivos, utilizando 3 amostras com valores diferentes, obtendo-se os seguintes resultados de absorbância:

Reprodutibilidade	AMOSTRA		
	1	2	3
<b>Média</b>	1,575	1,670	0,007
<b>Desvio Padrão</b>	0,057	0,089	0,001
<b>Coefficiente de Variação (%)</b>	3,6	5,5	15,1

#### Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica do kit BIOLISA HBsAg foi determinada utilizando Padrão Internacional (HBV genotype B4, HBsAg subtypes ayw1/adw2) WHO NIBSC 12/226. A sensibilidade analítica encontrada foi de 0,05 UI/mL ou 0,2 ng/mL.

#### Sensibilidade e Especificidade Clínica

O kit BIOLISA HBsAg analisou amostras clínicas em comparação com outro kit de EIA. Os resultados mostram que a sensibilidade clínica do kit BIOLISA HBsAg é >99,9% e a especificidade clínica é de >99,9%.

RESULTADO	REFERÊNCIA			
	Positivo	Negativo	Total	
BIOLISA HBsAg	Positivo	96	0	96
	Negativo	0	154	154
	Total	96	154	250

Sensibilidade Clínica: >99,9% (96/96) - IC 95% (96,2% - 100%)  
Especificidade Clínica: >99,9% (154/154) - IC 95% (97,6% - 100%)

### SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

A Hepatite B é uma doença infecciosa causada pelo vírus HBV que acomete o fígado. O vírus HBV é transmitido através do contato sexual, exposição pelo sangue (incluindo compartilhamento de objetos perfurocortantes) e transmissão de mãe para filho via placentária ou durante o parto. A infecção pelo HBV resulta em um número aparente de marcadores sorológicos e um dos primeiros desses marcadores é o Antígeno de Superfície de Hepatite B (HBsAg). Os principais subtipos de HBsAg incluem ad e ay, todos compartilhando o determinante comum 'a'. O HBsAg aparece entre 1 e 10 semanas após a infecção e antes das evidências bioquímicas da doença hepática ou icterícia. No entanto, para a maioria das pessoas, devido à sua alta produção, o HBsAg pode ser detectado após 30 dias da infecção. Este período é conhecido como janela diagnóstica. No estado de portador crônico, o HBsAg persiste por mais de 6 meses. Os anticorpos contra os antígenos do HBV aparecem entre 30 e 60 dias após a infecção, variando entre indivíduos. Este é o período conhecido como janela imunológica. A infecção pelo HBV pode provocar infecção aguda auto-limitante, hepatite fulminante, hepatite crônica com progressão para cirrose e insuficiência hepática, e estado de portador crônico assintomáticos. O vírus HBV em pessoas infectadas, persiste para o resto de suas vidas e pode ser transmitido para outras pessoas. Assim, a hepatite B se tornou um problema de saúde pública. Portanto, a triagem para HBsAg é recomendado para todos os doadores, mulheres grávidas e pessoas em grupos de alto risco.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN JUNIOR, L. V.; ANSEL, H. C. Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. 10. ed. Baltimore: Wolters Kluwer, 2014. 809 p.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE. EP-25A: Evaluation of Stability of In Vitro Diagnostic Reagents; Approved Guideline. Wayne: Clinical And Laboratory Standard Institute, 2009. 52 p.
- DESPANDE, S.S. Enzyme Immunoassays: from concept to development. New York: Chapman & Hall, 1996. 472 p.
- TSITSILONIS, Ourania E.; THRASYVOULIDES, Apollon; BALAFAS, Apostolos; VOUTSAS, John F.; PAPAMICHAIL, Michael; LYMBER I, Peggy. Serological detection of hepatitis B viral infection by a panel of solid-phase enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis, [S.L.], v. 34, n. 4, p. 811-822, mar. 2004. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0731-7085\(03\)00563-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0731-7085(03)00563-6).
- WHO. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations and stability of blood, plasma and serum samples. WHO/DIL/LAB/99.1 rev. 2, 2002:31.
- QUIBASA: Dados do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento

### GARANTIA DE QUALIDADE

Antes de serem liberados para consumo, todos os reagentes **Bioclin** são testados pelo Departamento de Controle de Qualidade. A qualidade dos reagentes é assegurada até a data de validade mencionada na embalagem de apresentação, desde que armazenados e transportados nas condições adequadas.

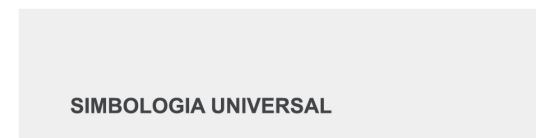
**QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda**  
Rua Teles de Menezes, 92 – Santa Branca  
CEP 31565-130 – Belo Horizonte – MG – Brasil  
Tel.: (31) 3439.5454 | E-mail: [bioclin@bioclin.com.br](mailto:bioclin@bioclin.com.br)  
CNPJ: 19.400.787/0001-07 – Indústria Brasileira

### ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR

Serviço de Assessoria ao Cliente  
Tel.: 0800 0315454 | E-mail: [sac@bioclin.com.br](mailto:sac@bioclin.com.br)

**Número de Registro do kit BIOLISA HBsAg na ANVISA:**  
10269360288

**Revisão:** Fevereiro/2025



	NÚMERO DE CATÁLOGO		FABRICADO POR
	NÚMERO DO LOTE		CONTROLE
	DATA DE FABRICAÇÃO		CONTROLE POSITIVO
	DATA DE VALIDADE (último dia do mês)		CONTROLE NEGATIVO
	LIMITE DE TEMPERATURA (conservar a)		RISCO BIOLÓGICO
	O CONTEÚDO É SUFICIENTE PARA <N> TESTE		INFLAMÁVEL
	CONSULTAR INSTRUÇÕES DE USO		CORROSIVO
	PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO		TÓXICO
	PROTEGER DA LUZ E CALOR		NÃO UTILIZAR SE A EMBALAGEM ESTIVER DANIFICADA
	NÃO REUTILIZE		PRODUTO ESTERILIZADO
	CUIDADO		PERIGO

## BIOLISA HBsAg

**REF K120**

### INSTRUCCIONES DE USO

#### FINALIDAD

Prueba de detección cualitativa de la presencia del antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B en muestras biológicas (suero y plasma recolectados con EDTA o Heparina), mediante una prueba de inmunoensayo enzimático. Solamente para uso de diagnóstico *in vitro*.

#### PRINCIPIO DE ACCIÓN

**Metodología:** Enzimmunoensayo o inmunoenzimático  
El kit BIOLISA HBsAg es un inmunoensayo enzimático en fase sólida basado en el principio "sándwich" para la detección de HBsAg en suero o plasma humano (EDTA o Heparina). La microplaca está recubierta con anticuerpos monoclonales específicos para los subtipos Ad y Ay de HBsAg. En primer lugar, se añaden la muestra y el conjugado a la microplaca recubierta de anticuerpo y se incuban. Si la muestra contiene HBsAg, se unirá a los anticuerpos que recubren la microplaca y, simultáneamente, se unirá al conjugado para formar complejos Anticuerpo-HBsAg-Conjugado. Después de la incubación, la microplaca se lava para eliminar los materiales no unidos. Luego de este paso, se agrega el Sustrato y se incuba, produciendo un color azul que indica la presencia del antígeno de la Hepatitis B presente en la muestra. Se agrega la solución de parada para detener la reacción, lo que produce un cambio de azul a amarillo, medido en un lector de microplacas.

#### REACTIVOS

**1- Placa Sensibilizada** - Almacenar entre 2 y 8 °C. Contiene: Microplaca recubierta con anticuerpos anti-HBs (monoclonales de ratón).

**2- Conjugado** - Almacenar entre 2 y 8 °C. Contiene: Anticuerpos anti-HBs ligados a peroxidasa, tensioactivo, estabilizantes, colorante y conservante.

**3- Lavagem Concentrada** - Almacenar entre 2 y 8 °C. Contiene: Solución tampón (Fosfato < 0,5 mol/L, Cloruro de potasio < 100 mmol/L, Cloruro de sodio < 5 mol/L), tensioactivo y conservante.

**4- Substrato** - Almacenar entre 2 y 8 °C. Contiene: Solución tampón que contiene peróxido de urea, tetrametilbencidina (TMB) y conservante.

**5- Solução de Parada** - Almacenar entre 2 y 8 °C. Ácido Sulfúrico 1N.

**6- Controle Negativo** - Almacenar entre 2 y 8 °C. Contiene: Solución no reactiva para HBsAg, HCV, HIV-1 y HIV-2, estabilizador y conservante. **Potencialmente infeccioso.**

**7- Controle Positivo** - Almacenar entre 2 y 8 °C. Contiene: Solución reactiva para HBsAg y no reactiva para HCV, HIV-1 y HIV-2, colorante, estabilizante y conservante. **Potencialmente infeccioso.**

**8- Selladores de Placa.**

#### PRESENTACIÓN

REACTIVOS	1	2	3
	96 Cavidades	192 Cavidades	480 Cavidades
<b>1- Placa Sensibilizada</b>	1 Unidad	2 Unidades	5 Unidades
<b>2- Conjugado</b>	1 Vial x 8 mL	2 Viales x 8 mL	5 Viales x 8 mL
<b>3- Lavado Concentrado</b>	1 Vial x 50 mL	2 Viales x 50 mL	5 Viales x 50 mL
<b>4- Sustrato</b>	1 Vial x 12 mL	2 Viales x 12 mL	5 Viales x 12 mL
<b>5- Solución de Parada</b>	1 Vial x 12 mL	2 Viales X 12 mL	5 Viales x 12 mL
<b>6- Control Negativo</b>	1 Vial x 1 mL	2 Viales x 1 mL	5 Viales x 1 mL
<b>7- Control Positivo</b>	1 Vial x 1 mL	2 Viales x 1 mL	5 Viales x 1 mL
<b>8- Selladores de Placa</b>	3 Unidades	5 Unidades	10 Unidades

#### EQUIPOS E INSUMOS OPERACIONALES

**Materiales contenidos en el kit:**

- Reactivos descritos en el cuadro anterior

**Materiales necesarios, no contenidos en los kit:**

**1-** Pipetas capaces de dispensar volúmenes de 5 a 300 µL con un coeficiente de variación inferior al 1,5%.

**2-** Repipetador para pipeteo repetitivo de volúmenes de 300 µL con coeficiente de variación inferior al 1,5% o pipeta multicanal (opcional).

**3-** Lavadora de microplacas (opcional).

**4-** Lector de ELISA con capacidad de absorbancia a 450 y 630 nm de longitud de onda.

**5-** Papel absorbente para secar las microcavidades.

**6-** Cronómetro o reloj.

**7-** Vial para almacenar la Solución de Lavado después de la dilución.

**8-** Agua destilada o desionizada.

**9-** Herramientas de Control de Calidad.

**10-** Incubadora de 10- 37 °C ± 2 °C.

#### CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

La temperatura de almacenamiento debe ser de 2 a 8 °C. El transporte, a temperatura ambiente (hasta 30 °C), no debe exceder los 5 días. Mantener alejado de la luz y evitar la humedad. **No congelar.**

#### CUIDADOS ESPECIALES

**1- Únicamente para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.**

**2-** Seguir estrictamente la metodología propuesta para obtener resultados exactos.

**3-** El sobre que contiene la microplaca sólo debe abrirse después de alcanzar la temperatura ambiente. Devuelva las tiras de micropocillos no utilizadas al sobre, ciérrelo y guárdelo entre 2 y 8 °C.

**4-** El agua utilizada para limpiar el material debe ser reciente y libre de contaminantes.

**5-** Las columnas desionizantes saturadas liberan agua alcalina, diversos iones y agentes oxidantes y reductores que pueden alterar significativamente los resultados.

**6-** La solución de parada contiene ácido sulfúrico, que es un ácido fuerte. Por lo tanto, manéjelo con el debido cuidado.

**7-** Todas las materias primas del producto están probadas y no deben ser reactivas para Anti-HIV 1&2 y Anti-HCV. Sin embargo,

estas pruebas no ofrecen total seguridad de la ausencia de agentes infecciosos. La manipulación de cualquier producto que contenga suero es potencialmente capaz de transmitir enfermedades. Por lo tanto, es necesario tomar las precauciones de bioseguridad adecuadas al manipular estos productos.

**8-** Pipetear siempre los reactivos en el mismo orden para minimizar la diferencia de tiempo de reacción entre las microcavidades.

**9-** Como medida de protección, la placa debe estar cubierta durante la reacción.

**10-** Se debe asegurar que el fondo de la cavidad esté limpio y seco, y que no haya burbujas en la superficie del líquido antes de leer la placa. No permita que los pocillos se sequen durante la prueba.

**11-** No exponer los reactivos, especialmente el Sustrato, a luz fuerte o vapores de hipoclorito durante las etapas de almacenamiento o incubación.

**12-** Recomendamos aplicar normas de protección ambiental locales, estatales y federales para que los reactivos y material biológico sean dispuestos de acuerdo con la legislación vigente.

**13-** Para obtener información relacionada con la seguridad biológica o en caso de accidentes con el producto, consultar la HDS (Hoja de Datos de Seguridad) disponibles en el site [www.bioclin.com.br](http://www.bioclin.com.br) o solicitando a través del SAC (Servicio de Asesoría al Cliente) de Quibasa.

**14-** No utilice el producto si el embalaje está dañado.

**15-** Es imprescindible que los instrumentos y equipos utilizados estén debidamente calibrados y sometidos a mantenimiento periódico.

#### MUESTRAS

**Suero o plasma (EDTA o Heparina).**

No se deben utilizar muestras hemolizadas y altamente lipémicas. Las muestras se pueden almacenar en refrigeración, entre 2 y 8 °C, por un período máximo de 5 días. Si las muestras no se pueden analizar en un plazo de 5 días, se pueden almacenar hasta 30 días a -20 °C. Las muestras de plasma almacenadas por períodos superiores al recomendado (30 días) pueden presentar precipitación de fibrina y fibronectina que pueden interferir con la prueba. No se deben utilizar muestras recogidas con otros anticoagulantes distintos a los mencionados.

#### DESCRIPCIÓN DEL PROCESO

**Estabilidad Después de la Apertura**

Los resultados de la prueba de estabilidad demuestran que el kit BIOLISA HBsAg es estable después de abrirlo por hasta 30 días. Esta estabilidad puede variar según la prueba y las condiciones ambientales. Por lo tanto, se sugiere monitorear el desempeño del producto utilizando los controles internos del kit y los criterios de validación de la técnica.

#### PREPARO DE LOS REACTIVOS DE TRABAJO

**Solución de Lavado**

Diluir el contenido del Vial N° 3 (Lavado Concentrado) en una proporción 1:20 de agua destilada o desionizada; por ejemplo: 50 mL de solución de Lavado Concentrado en 1000 mL de agua destilada o desionizada. Después de la preparación, la solución se puede almacenar entre 2 y 30 °C hasta por 30 días. Si se produce cristalización, calentar a 37 °C hasta que se disuelva.

**Nota:** En el reactivo No. 3 (Concentrated Wash) pueden formarse pequeños agregados gelatinosos, que se disuelven fácilmente después de la dilución. Por lo tanto, si se observa esta característica en el reactivo, proceda normalmente como se ha descrito anteriormente.

**Todos los demás reactivos están listos para usar**

#### TÉCNICA

**Para uso en equipos automáticos consultar con SAC (Servicio de Asesoramiento al Cliente).**

Antes de comenzar el ensayo, coloque todos los reactivos,

PARA OBTENER LAS INSTRUCCIONES DE USO EN FORMATO IMPRESO, SIN COSTO ADICIONAL, CONTACTE CON EL SERVICIO DE ASESORAMIENTO AL CLIENTE:

SAC: +55 (31) 3439 5454 / 0800 031 5454 / [sac@bioclin.com.br](mailto:sac@bioclin.com.br)

muestras y controles para que se establezcan a temperatura ambiente (15 – 30 °C) durante al menos 40 minutos.

**1-** Separar las cavidades a utilizar considerando: Controles y Muestras (se recomienda realizar pruebas por duplicado). Devuelva las tiras de microplacas no utilizadas al embalaje sellado original.

**2-** Separar la primera cavidad para el Blanco (OPCIONAL).

**3-** Pipetear 50 µL de Control Negativo, Control Positivo y Muestras en los pocillos previamente determinados.

**4-** Pipetee 50 µL de Conjugado en todos los pocillos, **excepto** en el pocillo blanco.

**5-** Homogeneizar suavemente durante ± 30 segundos. Cubra las cavidades con sellador de placas.

**6-** Incubar durante 80 minutos ± 2 minutos a 37 °C ± 2 °C.

**7-** Retirar el sellador de placas de las cavidades.

**8-** Desechar el contenido de las cavidades mediante succión (Lavadora) o decantación (Manual). Utilice aproximadamente 350 µL de Solución de Lavado, **previamente preparada**, y realice un total de ocho (8) ciclos de lavado con agitación de 5 segundos. Para asegurar que el plato se seque, al final del lavado, golpee el plato durante unos segundos sobre papel absorbente.

**Nota:** Un mal lavado/secado puede provocar resultados inadecuados.

**9-** Pipetee 100 µL de Sustrato en todos los pocillos, **incluido** el pocillo blanco.

**10-** Homogeneizar suavemente durante ± 30 segundos. Cubra las cavidades con sellador de placas.

**11-** Incubar durante 10 minutos ± 2 minutos a 37 °C ± 2 °C.

**12-** Retirar el sellador de placas de las cavidades.

**13-** Pipetee 100 µL de solución de parada en todos los pocillos.

**14-** Homogeneizar suavemente durante ± 30 segundos.

**15-** Leer usando doble filtro: 450 nm / 630 nm en hasta 15 minutos (máximo).

#### VERIFICACIÓN DE LA TÉCNICA

Verifique si los resultados obtenidos para lectura de los controles son compatibles con los valores presentados abajo:

ITEM	ABSORBANCE
Blanco	< 0,100
Control Negativo	< 0,100
Control Positivo	> 1,000

**Nota:** Si se encuentran valores fuera de los especificados se debe repetir la técnica. Los valores de Controles y Muestras no deben restarse del valor del Blanco, si se optó por utilizarlo.

#### CÁLCULOS

#### QUALITATIVO

Calcule el cut-off de acuerdo con la siguiente fórmula:

Cut-Off: Absorbancia Promedio Obtenida con Control Negativo + 0,050.

Ejemplo:

ITEM	ABSORBANCIA
Control Negativo	A1 = 0,040
	A2 = 0,041
Cut-Off: (Absorbancia promedio del control negativo) + 0,050	(0,040 + 0,041) / 2 + 0,050 = 0,091

Calcular el Índice dividiendo la absorbancia de la muestra por el valor de Cut Off.

Ejemplo:

ITEM	ABSORBANCIA
Muestra	2,145
Valor de Cut-Off	0,091
Índice = Muestra / Valor de Cut-Off	2,145 / 0,091 = 23,6

**Nota:** Los datos presentados en los ejemplos son meramente ilustrativos y no pueden utilizarse para calcular resultados.

#### INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Después del cálculo del índice de las muestras, considerar los índices abajo para la determinación de los resultados.

RESULTADOS	INDICE
<b>Negativo (No Reactivo)</b>	< 0,9
<b>Indeterminado</b>	Entre 0,9 y 1,1
<b>Positivo (Reactivo)</b>	> 1,1

#### NO REACTIVO

Una muestra con una absorbancia inferior al punto de corte o un índice inferior a 0,9 se considera no reactiva para el antígeno de la hepatitis B y puede considerarse negativa.

#### REACTIVO

Una muestra con una absorbancia superior al punto de corte o un índice superior a 1,1 se considera inicialmente reactiva para el antígeno de la hepatitis B. La muestra debe volver a analizarse por duplicado antes de finalizar la interpretación. Una muestra que resulta reactiva en al menos uno de los reanálisis se presume positiva y debe confirmarse mediante un método confirmatorio.

**Nota:** En caso de un resultado indeterminado, la muestra debe volver a analizarse. Las muestras que produzcan resultados repetidamente indeterminados se deben volver a analizar utilizando un método alternativo. Si los resultados siguen siendo indeterminados, se debe recolectar una nueva muestra dentro de dos semanas. Debe prevalecer el resultado de la última muestra recogida. La interpretación de una prueba diagnóstica no debe establecerse basándose en un único ensayo. Se deben incluir otras pruebas de confirmación antes de que una muestra se considere positiva. Un resultado negativo no excluye la posibilidad de exposición. Todos los resultados deben interpretarse junto con otra información clínica disponible, antes del diagnóstico descriptivo de la enfermedad.

**Nota:** Los datos presentados en los ejemplos son solo para ilustración y no se pueden utilizar para calcular resultados.

#### LIMITACIONES DEL PROCESO

La interpretación de una prueba diagnóstica no debe establecerse en base a una única prueba. Todos los resultados deben interpretarse junto con otra información clínica disponible antes del diagnóstico definitivo. Los resultados proporcionados por este kit deben ser interpretados por el profesional médico responsable y no son el único criterio para determinar el diagnóstico y/o tratamiento del paciente.

**Nota:** Tenga cuidado de no tocar la superficie interior del pocillo con la punta de la pipeta cuando se dosifique el conjugado. Puede ocurrir contaminación.

#### INTEFERENTES

No se observaron interferencias para las concentraciones de Triglicéridos 1500 mg/dL, Ácido Acetilsalicílico 20 mg/dL, Ácido Ascórbico 2 g/dL, Creatinina 200 mg/dL, Bilirrubina 1 g/dL, Albúmina 10 g/dL, Hemoglobina 1000 mg/dL, Ácido Oxálico 60 mg/dL, Factor Reumatoide 980 UI/ mL, Proteína C Reactiva 41,2 mg/dL y Antiestreptolisina O 1023 UI/mL. Se pueden utilizar muestras de plasma recogidas en EDTA y heparina. No se podrán utilizar muestras recogidas con anticoagulantes distintos a los mencionados. Las muestras de plasma almacenadas por periodos superiores al recomendado (30 días) pueden presentar precipitación de fibrina y fibronectina que pueden interferir con

la prueba.

#### REACTIVIDAD CRUZADA

Se realizó un estudio de reactividad cruzada, evaluando 08 muestras positivas para HTLV, 08 muestras positivas para HIV, 08 muestras positivas para CMV, 08 muestras positivas para Enfermedad de Chagas, 08 muestras positivas para Zika, 08 muestras positivas para Rubéola, 08 muestras positivas para Toxoplasmosis y 08 muestras positivas para Sífilis. No se observó reactividad cruzada con muestras positivas para HTLV, HIV, CMV, Enfermedad de Chagas, Zika, Rubéola, Toxoplasmosis y Sífilis. A pesar de los resultados encontrados, no se puede descartar por completo la posibilidad de reactividad cruzada. El diagnóstico final debe considerar los datos clínicos del paciente junto con otros datos de laboratorio.

#### CONTROL INTERNO DE CALIDAD

El Laboratorio Clínico debe contar con un programa de control de calidad interno, donde estén claramente establecidos los procedimientos, estándares, límites y tolerancia a variaciones. Es importante resaltar que todos los sistemas de medición presentan una variabilidad analítica característica, la cual debe ser monitoreada por los propios laboratorios. Para ello, se recomienda utilizar controles, que permitan evaluar la precisión y exactitud de las dosificaciones.

#### CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO

#### PRECISIÓN

##### Repetibilidad

La repetibilidad fue calculada a partir de 20 determinaciones sucesivas, utilizando 3 muestras con concentraciones diferentes, obteniéndose los siguientes resultados:

Repetibilidad	MUESTRA		
	1	2	3
<b>Promedio</b>	1,709	1,500	0,019
<b>Desvío Patrón</b>	0,075	0,119	0,002
<b>Coefficiente de Variación (%)</b>	4,40	7,94	11,66

##### Reproductibilidad

La reproductibilidad fue calculada a partir de 20 determinaciones sucesivas durante 3 días consecutivos, utilizando 3 muestras con concentraciones diferentes, obteniéndose los siguientes resultados:

Reproductibilidad	MUESTRA		
	1	2	3
<b>Promedio</b>	1,575	1,670	0,007
<b>Desvío Patrón</b>	0,057	0,089	0,001
<b>Coefficiente de Variación (%)</b>	3,6	5,5	15,1

##### Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del kit BIOLISA HBsAg se determinó utilizando el estándar internacional (HBV genotipo B4, subtipos HBsAg ayw1/adw2) WHO NIBSC 12/226. La sensibilidad analítica encontrada fue de 0,05 UI/ml o 0,2 ng/ml.

##### Sensibilidad y Especificidad Clínicas

El kit BIOLISA HBsAg analizó muestras clínicas en comparación con otro kit EIA. Los resultados muestran que la sensibilidad clínica del kit BIOLISA HBsAg es >99,9% y la especificidad clínica es >99,9%.

RESULTADO	REFERENCIA			
	Positivo	Negativo	Total	
BIOLISA HBsAg	Positivo	96	0	96
	Negativo	0	154	154
	Total	96	154	250

Sensibilidad Clínica: >99,9% (96/96) - IC 95% (96,2% - 100%)  
Especificidad Clínica: >99,9% (154/154) - IC 95% (97,6% - 100%)

#### SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

La hepatitis B es una enfermedad infecciosa causada por el virus VHB que afecta al hígado. El virus VHB se transmite por contacto sexual, exposición a través de la sangre (incluido compartir objetos punzantes) y transmisión de madre a hijo a través de la ruta placentaria o durante el parto. La infección por VHB produce un número aparente de marcadores serológicos y uno de los primeros de estos marcadores es el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg). Los principales subtipos de HBsAg incluyen ad y ay, todos los cuales comparten el determinante común "a". El HBsAg aparece entre 1 y 10 semanas después de la infección y antes de que aparezcan pruebas bioquímicas de enfermedad hepática o ictericia. Sin embargo, para la mayoría de las personas, debido a su alta producción, el HBsAg puede detectarse después de 30 días de la infección. Este período se conoce como ventana de diagnóstico. En el estado de portador crónico, el HBsAg persiste durante más de 6 meses. Los anticuerpos contra los antígenos del VHB aparecen entre 30 y 60 días después de la infección, variando entre individuos. Este es el período conocido como ventana inmunológica. La infección por VHB puede causar infección aguda autolimitada, hepatitis fulminante, hepatitis crónica con progresión a cirrosis e insuficiencia hepática y estados de portador crónico asintomático. El virus VHB en personas infectadas persiste por el resto de sus vidas y puede transmitirse a otras personas. Así, la hepatitis B se ha convertido en un problema de salud pública. Por lo tanto, se recomienda realizar pruebas de detección de HBsAg a todos los donantes, mujeres embarazadas y personas de grupos de alto riesgo.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN JUNIOR, L. V.; ANSEL, H. C. Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. 10. ed. Baltimore: Wolters Kluwer, 2014. 809 p.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE. EP-25A: Evaluation of Stability of In Vitro Diagnostic Reagents; Approved Guideline. Wayne: Clinical And Laboratory Standard Institute, 2009. 52 p.
- DESHPANDE, S.S. Enzyme Immunoassays: from concept to development. New York: Chapman & Hall, 1996. 472 p.
- TSITSILONIS, Ourania E.; THRASYVOULIDES, Apollon; BALAFAS, Apostolos; VOUTSAS, John F.; PAPAMICHAIL, Michael; LYMBERI, Peggy. Serological detection of hepatitis B viral infection by a panel of solid-phase enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis, [S.L.], v. 34, n. 4, p. 811-822, mar. 2004. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0731-7085\(03\)00563-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0731-7085(03)00563-6).
- WHO. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations and stability of blood, plasma and serum samples. WHO/DIL/LAB/99.1 rev. 2, 2002:31.
- QUIBASA: Dados do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento

#### GARANTÍA DE CALIDAD

Antes de ser liberado para el consumo, todos los reactivos **Bioclin** son testados por el Departamento de Control de Calidad. La calidad de los reactivos es asegurada hasta la fecha de validez mencionada en el embalaje de presentación, desde que sean almacenados y transportados en las condiciones adecuadas.

**QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda**  
Rua Teles de Menezes, 92 – Santa Branca  
CEP 31565-130 – Belo Horizonte – MG – Brasil  
Tel.: +55 (31) 3439-5454 | E-mail: bioclin@bioclin.com.br  
CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira

#### ATENCIÓN AL CONSUMIDOR

Servicio de Asesoría al Cliente  
Tel.: 0800 0315454 | E-mail: sac@bioclin.com.br

**Número de Registro del kit BIOLISA HBsAg en la ANVISA:**  
10269360288

Revisión: Febrero/2025

## SIMBOLOGÍA UNIVERSAL

	NUMERO DE CATALOGO		FABRICADO POR
	NUMERO DE LOTE		CONTROLAR
	FECHA DE FABRICACION		CONTROL POSITIVO
	FECHA DE VALIDEZ (último día del mes)		CONTROL NEGATIVO
	LÍMITE DE TEMPERATURA (tienda)		RIESGO BIOLÓGICO
	EL CONTENIDO ES SUFICIENTE PARA <N> PRUEBA		INFLAMABLE
	VER INSTRUCCIONES DE USO		CORROSIVO
	PRODUCTO DE DIAGNÓSTICO IN VITRO		TÓXICO
	PROTEGER DE LUZ Y CALOR		NO UTILICE SI EL EMBALAJE ESTA DAÑADA
	NO REUTILIZA		PRODUCTO ESTERILIZADO
	PRECAUCIÓN		PELIGRO

## BIOLISA HBsAg

REF K120

### INSTRUCTIONS FOR USE

#### FUNCTION

Test for qualitative detection of the presence of Hepatitis B virus surface antigen in biological samples (serum and plasma collected with EDTA or Heparin), through enzyme immunoassay. For *in vitro* diagnostic use only.

#### PRINCIPLE OF ACTION

**Methodology:** Enzyme immunoassay or immunoenzymatic assay based on the "sandwich" principle for the detection of HBsAg in human serum or plasma (EDTA or Heparin). The microplate is coated with monoclonal antibodies specific for the Ad and Ay subtypes of HBsAg. First, the sample and conjugate are added to the antibody-coated microplate and incubated. If the sample contains HBsAg, it will bind to the antibodies coated on the microplate and, simultaneously, will bind to the conjugate to form Antibody-HBsAg-Conjugate complexes. After incubation, the microplate is washed to remove unbound materials. After this step, the Substrate is added and incubated, producing a blue color that indicates the presence of Hepatitis B antigen in the sample. Stop Solution is added to stop the reaction, resulting in a color change from blue to yellow, measured on a microplate reader.

#### REAGENTS

- 1- Sensitized Plate** - Store between 2 and 8 °C. Contains: Microplate coated with anti-HBs antibodies (mouse monoclonal).
- 2- Conjugate** - Store between 2 and 8 °C. Contains: Anti-HBs antibodies linked to Peroxidase, surfactant, stabilizers, dye and preservative.
- 3- Concentrated Wash** - Store between 2 and 8 °C. Contains: Buffer solution (Phosphate < 0.5 mol/L, Potassium Chloride < 100 mmol/L, Sodium Chloride < 5 mol/L), surfactant and preservative.
- 4- Substrate** - Store between 2 and 8 °C. Contains: Buffer solution containing Urea Peroxide, Tetramethylbenzidine (TMB) and preservative.
- 5- Stop Solution** - Store between 2 and 8 °C. Contains: 1 N sulfuric acid.
- 6- Negative Control** - Store between 2 and 8 °C. Contains: Non-reactive solution for HBsAg, HCV, HIV-1 and HIV-2, stabilizer and preservative. **Potentially infectious.**
- 7- Positive Control** - Store between 2 and 8 °C. Contains: Reactive solution for HBsAg and non-reactive for HCV, HIV-1 and HIV-2, dye, stabilizer and preservative. **Potentially infectious.**
- 8- Plate Sealers.**

#### PRESENTATION

REAGENTS	1	2	3
	96 Cavities	192 Cavities	480 Cavities
<b>1- Sensitized Plate</b>	1 Unit	2 Units	5 Units
<b>2- Conjugate</b>	1 Vial x 8 mL	2 Vials x 8 mL	5 Vials x 8 mL
<b>3- Concentrated Washing</b>	1 Vial x 50 mL	2 Vials x 50 mL	5 Vials x 50 mL
<b>4- Substrate</b>	1 Vial x 12 mL	2 Vials x 12 mL	5 Vials x 12 mL
<b>5- Stop Solution</b>	1 Vial x 12 mL	2 Vials x 12 mL	5 Vials x 12 mL
<b>6- Negative Control</b>	1 Vial x 1 mL	2 Vials x 1 mL	5 Vials x 1 mL
<b>7- Positive Control</b>	1 Vial x 1 mL	2 Vials x 1 mL	5 Vials x 1 mL
<b>8- Plate Sealers</b>	3 Units	5 Units	10 Units

#### EQUIPMENTS AND OPERATIONAL INPUTS

##### Materials in the kit:

- Reagents described in the above table

##### Required materials not contained in the kit:

- Pipettes capable of dispensing volumes from 5 to 300 µL with a coefficient of variation lower than 1.5%.
- Repipette for repetitive pipetting of volumes of 300 µL with a coefficient of variation lower than 1.5% or multichannel pipette (optional).
- Microplate washer (optional).
- ELISA reader with absorbance capacity at 450 and 630 nm wavelength.
- Absorbent paper to dry the microwells.
- Timer or clock.
- Vial to store the Washing Solution after dilution.
- Distilled or deionized water.
- Quality Control Tools.
- Incubator at 37 °C ± 2 °C.

#### TRANSPORTATION AND STORAGE CONDITIONS

The storage temperature should be between 2 and 8 °C. Transportation at room temperature (up to 30 °C) should not exceed 5 days. Keep away from light and avoid humidity. **Do not freeze.**

#### SPECIAL CARE

- For professional *in vitro* diagnostic use only.**
- Strictly follow the proposed methodology to obtain accurate results.
- The sachet containing the microplate should only be opened after it has reached room temperature. Replace the unused microwell strips in the sachet, seal and store between 2 and 8 °C.
- The water used to clean the material must be fresh and free of contaminants.
- Saturated deionizing columns release alkaline water, various ions, and oxidizing and reducing agents that can significantly alter the results.
- The Stop Solution contains Sulfuric Acid, which is a strong acid. Therefore, handle it with due care.
- All raw materials of the product are tested and must be non-reactive for Anti-HIV 1&2 and Anti-HCV. However, these tests

TO OBTAIN THE INSTRUCTIONS FOR USE IN PRINTED FORMAT, AT NO ADDITIONAL COST, CONTACT CUSTOMER ADVISORY SERVICE:

SAC: +55 (31) 3439 5454 / 0800 031 5454 / sac@bioclin.com.br

do not offer total assurance of the absence of infectious agents. Handling any product containing serum is potentially capable of transmitting diseases. Therefore, it is necessary to take appropriate biosafety precautions when handling these products.

**8-** Always pipette the reagents in the same order to minimize the difference in reaction time between the microcavities.

**9-** As a protective measure, the plate should be covered during the reaction.

**10-** Ensure that the bottom of the well is clean and dry, and that there are no bubbles on the surface of the liquid before reading the plate. Do not allow the wells to dry out during the test.

**11-** Do not expose the reagents, especially the Substrate, to strong light or hypochlorite vapors during storage or incubation stages.

**12-** We recommend applying local, state and federal environmental protection standards so that the disposal of reagents and biological material is done in accordance with current legislation.

**13-** To obtain information related to biosafety or in case of accidents with the product, consult the SDS (Safety Data Sheet) available on the website www.bioclin.com.br or through a request through SAC (Customer Advisory Service) from Quibasa.

**14-** Do not use the product if the packaging is damaged.

**15-** It is essential that the instruments and equipment used are properly calibrated and undergo periodic maintenance.

#### SAMPLES

##### Serum or plasma (EDTA or Heparin).

Hemolyzed and highly lipemic samples should not be used. Samples can be stored under refrigeration, between 2 and 8 °C, for a maximum period of 5 days. If samples cannot be analyzed within 5 days, they can be stored for up to 30 days at a temperature of -20 °C. Plasma samples stored for periods longer than the recommended period (30 days) may present fibrin and fibronectin precipitation that may interfere with the test. Samples collected with anticoagulants other than those mentioned should not be used.

#### PROCESS DESCRIPTION

##### Stability After Opening

The results of the stability test show that the BIOLISA HBsAg kit is stable after opening for up to 30 days. This stability may vary according to the test conditions and the environment. Therefore, it is suggested to monitor the performance of the product using the kit's internal controls and the technique validation criteria.

#### PREPARATION OF WORKING REAGENT

##### Washing Solution

Dilute the contents of Vial No. 3 (Concentrated Wash) in a ratio of 1:20 with distilled or deionized water; for example: 50 mL of Concentrated Washing Solution in 1000 mL of distilled or deionized water. After preparation, the solution can be stored at 2 to 30 °C for up to 30 days. If crystallization occurs, heat to 37 °C until dissolved.

**Note:** Small gelatinous aggregates may form in reagent No. 3 (Concentrated Wash), which are easily dissolved after dilution. Therefore, if this characteristic is observed in the reagent, proceed normally as described above.

**All other reagents are ready for use.**

#### TECHNIQUE

##### For use in automatic equipment, consult the Customer Service Department (SAC).

Before starting the test, place all reagents, samples and controls to stabilize at room temperature (15 – 30 °C) for at least 40 minutes.

- Separate the wells to be used considering: Controls and

Samples (it is recommended to test in duplicate). Return the unused strips of the microplate to the original sealed packaging.

**2-** Separate the first well for the Blank (OPTIONAL).

**3-** Pipette 50 µL of Negative Control, Positive Control and Samples into the previously determined wells.

**4-** Pipette 50 µL of Conjugate into all wells, except the Blank well (if you have chosen to use it).

**5-** Gently mix for ± 30 seconds. Cover the wells with plate sealer.

**6-** Incubate for 80 minutes ± 2 minutes at 37 °C ± 2 °C.

**7-** Remove the plate sealer from the wells.

**8-** Discard the contents of the wells by aspiration (Washer) or by decantation (Manual). Use approximately 350 µL of Washing Solution, previously prepared, and perform a total of eight (8) washing cycles with shaking for 5 seconds.

To ensure that the plate is dry, at the end of the wash, tap the plate for a few seconds on absorbent paper.

**Note:** Inadequate washing/drying may cause inadequate results.

**9-** Pipette 100 µL of Substrate into all wells, including the Blank well.

**10-** Gently mix for ± 30 seconds. Cover the wells with the plate sealer.

**11-** Incubate for 10 minutes ± 2 minutes at 37 °C ± 2 °C.

**12-** Remove the plate sealer from the wells.

**13-** Pipette 100 µL of Stop Solution into all wells.

**14-** Gently mix for ± 30 seconds.

**15-** Read using a double filter: 450 nm / 630 nm in up to 15 minutes (maximum).

#### TECHNIQUE VERIFICATION

Check whether the results obtained for reading the Controls are compatible with the values presented below:

ITEM	ABSORBANCE
Blank	< 0.100
Negative Control	< 0.100
Positive Control	> 1.000

**Note:** If the values are found outside the specified range, the technique must be repeated. The values of the Controls and Samples must not be subtracted from the Blank value, if the option to use it has been chosen.

#### CALCULATIONS

##### QUALITATIVE

Calculate the Cut-Off according to the following formula:

Cut-Off: Average Absorbance Obtained with the Negative Control + 0.050.

Example:

ITEM	ABSORBANCE
Negative Control	A1 = 0.040
	A2 = 0.041
Cut-Off: (Average Absorbance of Negative Control) + 0.050	(0.040 + 0.041) / 2 + 0.050 = 0.091

Calculate the Index by dividing the absorbance of the sample by the Cut Off value.

Example:

ITEM	ABSORBANCIA
Sample	2.145
Cut-Off Value	0.091
Index = Sample / Cut-Off Value	2.145 / 0.091 = 23.6

**Nota:** Los datos presentados en los ejemplos son meramente ilustrativos y no pueden utilizarse para calcular resultados.

#### INTERPRETATION OF RESULTS

After calculating the sample index, consider the indexes below to determine the results.

RESULTS	INDEX
Negative (No Reactive)	< 0.9
Indeterminate	Between 0.9 and 1.1
Positive (Reactive)	> 1.1

#### NO REACTIVE

A sample with absorbance lower than the cut-off or index lower than 0.9 is considered non-reactive for Hepatitis B antigen and can be considered negative.

#### REACTIVE

A sample with an absorbance higher than the cut-off or an index higher than 1.1 is initially considered reactive for Hepatitis B antigen. The sample should be reanalyzed in duplicate before the end of the interpretation. A sample that is reactive in at least one of the reanalysis is presumed to be positive and should be confirmed using a confirmatory method.

**Nota:** In the case of an indeterminate result, the sample should be reanalyzed. Samples that repeatedly yield indeterminate results should be retested using an alternative method. If the results remain indeterminate, a new sample should be collected in two weeks. The result of the last sample collected should prevail. The interpretation of a diagnostic test should not be based on a single assay. Other confirmatory tests should be included before a sample is considered positive. A negative result does not exclude the possibility of exposure. All results should be interpreted in conjunction with other available clinical information before a descriptive diagnosis of the disease is made.

**Nota:** The data presented in the examples are for illustration purposes only and cannot be used to calculate results.

#### LIMITATIONS OF THE PROCESS

The interpretation of a diagnostic test should not be based on a single assay. All results should be interpreted in conjunction with other available clinical information before a definitive diagnosis is made. The results provided by this kit should be interpreted by the responsible medical professional and are not the sole criterion for determining the diagnosis and/or treatment of the patient.

**Nota:** Be careful not to touch the inner surface of the well with the pipette tip when the conjugate is dispensed. Contamination may occur.

#### INTERFERENTS

No interference was observed for Triglycerides 1500 mg/dL, Acetylsalicylic Acid 20 mg/dL, Ascorbic Acid 2 g/dL, Creatinine 200 mg/dL, Bilirubin 1 g/dL, Albumin 10 g/dL, Hemoglobin 1000mg/dL, Oxalic Acid 60 mg/dL, Rheumatoid Factor 980 UI/mL, C-Reactive Protein 41.2 mg/dL and Anti-Streptolysin O 1023 UI/mL. Plasma samples collected in EDTA and Heparin can be used. Samples collected with anticoagulants other than those mentioned cannot be used. Plasma samples stored for periods longer than recommended (30 days) may present fibrin and fibronectin precipitation that can interfere with the test.

#### CROSS-REACTIVITY

A cross-reactivity study was performed, evaluating 08 samples positive for HTLV, 08 samples positive for HIV, 08 samples

positive for CMV, 08 samples positive for Chagas disease, 08 samples positive for Zika, 08 samples positive for Rubella, 08 samples positive for Toxoplasmosis and 08 samples positive for Syphilis. No cross-reactivity was observed with samples positive for HTLV, HIV, CMV, Chagas disease, Zika, Rubella, Toxoplasmosis and Syphilis. Despite the results found, the possibility of cross-reactivity cannot be completely ruled out. The final diagnosis should consider the patient's clinical data together with other laboratory data.

#### INTERNAL QUALITY CONTROL

The Clinical Laboratory must have an internal quality control program, where procedures, standards, limits and tolerance for variations are clearly established. It is important to emphasize that all measurement systems present a characteristic analytical variability, which must be monitored by the laboratories themselves. To this end, it is recommended to use controls, which allow the assessment of the precision and accuracy of the dosages.

#### PRODUCT PERFORMANCE

##### PRECISION

##### Repeatability

Repeatability was calculated from 10 successive determinations, using 3 samples with different values, obtaining the following absorbance results:

Repeatability	SAMPLE		
	1	2	3
Average	1.709	1.500	0.019
Standard Deviation	0.075	0.119	0.002
Coefficient of Variation (%)	4.40	7.94	11.66

##### Reproducibility

Reproducibility was calculated from 10 successive determinations over 3 consecutive days, using 3 samples with different values, obtaining the following absorbance results:

Reproducibility	SAMPLE		
	1	2	3
Average	1.575	1.670	0.007
Standard Deviation	0.057	0.089	0.001
Coefficient of Variation (%)	3.6	5.5	15.1

##### Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity of the BIOLISA HBsAg kit was determined using the International Standard (HBV genotype B4, HBsAg subtypes ayw1/adw2) WHO NIBSC 12/226. The analytical sensitivity found was 0.05 UI/mL or 0.2 ng/mL.

##### Clinical Sensitivity and Specificity

The BIOLISA HBsAg kit analyzed clinical samples in comparison with another EIA kit. The results show that the clinical sensitivity of the BIOLISA HBsAg kit is >99.9% and the clinical specificity is >99.9%.

RESULT		REFERENCE		
		Positive	Negative	Total
BIOLISA HBsAg	Positive	96	0	96
	Negative	0	154	154
	Total	96	154	250

Clinical Sensitivity: >99.9% (96/96) - IC 95% (96.2% - 100%)

Clinical Specificity: >99.9% (154/154) - IC 95% (97.6% - 100%)

#### DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE

Hepatitis B is an infectious disease caused by the HBV virus that affects the liver. The HBV virus is transmitted through sexual contact, blood-borne exposure (including sharing sharp objects), and mother-to-child transmission via the placenta or during childbirth. HBV infection results in a number of apparent serological markers, and one of the earliest of these markers is Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg). The major subtypes of HBsAg include ad and ay, all sharing the common determinant 'a'. HBsAg appears between 1 and 10 weeks after infection and before biochemical evidence of liver disease or jaundice. However, in most people, due to its high production, HBsAg can be detected after 30 days of infection. This period is known as the diagnostic window. In the chronic carrier state, HBsAg persists for more than 6 months. Antibodies against HBV antigens appear between 30 and 60 days after infection, varying between individuals. This is the period known as the immunological window. HBV infection can cause acute self-limiting infection, fulminant hepatitis, chronic hepatitis with progression to cirrhosis and liver failure, and asymptomatic chronic carrier states. The HBV virus in infected individuals persists for the rest of their lives and can be transmitted to others. Thus, hepatitis B has become a public health problem. Therefore, screening for HBsAg is recommended for all donors, pregnant women, and individuals in high-risk groups.

#### BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- ALLEN JUNIOR, L. V.; ANSEL, H. C. Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. 10. ed. Baltimore: Wolters Kluwer, 2014. 809 p.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE. EP-25A: Evaluation of Stability of In Vitro Diagnostic Reagents; Approved Guideline. Wayne: Clinical And Laboratory Standard Institute, 2009. 52 p.
- DESHPANDE, S.S. Enzyme Immunoassays: from concept to development. New York: Chapman & Hall, 1996. 472 p.
- TSITSILONIS, Ourania E.; THRASYVOULIDES, Apollon; BALAFAS, Apostolos; VOUTSAS, John F.; PAPAMICHAIL, Michael; LYMBERI, Peggy. Serological detection of hepatitis B viral infection by a panel of solid-phase enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis, [S.L.], v. 34, n. 4, p. 811-822, mar. 2004. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0731-7085\(03\)00563-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0731-7085(03)00563-6).
- WHO. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations and stability of blood, plasma and serum samples. WHO/DIL/LAB/99.1 rev. 2, 2002:31.
- QUIBASA: Dados do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento

#### QUALITY ASSURANCE

Before being released for consumption, all Bioclin reagents are tested by the Department of Quality Control. The quality of reagents is assured until expiration date stated on the presentation packaging, when stored and transported under appropriate conditions.

#### QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda

Rua Teles de Menezes, 92 - Santa Branca  
CEP 31565-130 - Belo Horizonte - MG - Brasil  
Phone: +55 (31) 3439.5454 | E-mail: [bioclin@bioclin.com.br](mailto:bioclin@bioclin.com.br)  
CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Made in Brazil

#### CUSTOMER SERVICE

Customer Advisory Service  
Phone.: 0800 0315454 | E-mail: [sac@bioclin.com.br](mailto:sac@bioclin.com.br)

ANVISA registration for BIOLISA HBsAg kit: 10269360288

Review: February/2025

### UNIVERSAL SYMBOLOGY

	CATALOG NUMBER		MADE BY
	LOT NUMBER		CONTROL
	MANUFACTURING DATE		POSITIVE CONTROL
	VALIDITY DATE (last day of the month)		NEGATIVE CONTROL
	TEMPERATURE LIMIT (store)		BIOLOGICAL RISK
	CONTENT IS SUFFICIENT FOR <N> TEST		FLAMMABLE
	SEE INSTRUCTIONS FOR USE		CORROSIVE
	IN VITRO DIAGNOSTIC PRODUCT		TOXIC
	KEEP AWAY FROM SUNLIGHT		DO NOT USE IF PACKAGE IS DAMAGED
	DO NOT REUSE		PRODUCT STERILIZED
	CAUTION		DANGER